AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 68, №2, səh. 59-68 (2013)

Prenatal Ontogenezin İki Mərhələsində Hipoksiyaya Məruz Qalmış Ağ Siçovulların Baş Beynində Piruvatkinazanın Fəallığının Müqayisəli Analizi

A.M. Rəşidova, T.M. Ağayev

AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu, Şərifzadə küç., 2, *Bakı AZ1100, Azərbaycan;*
E-mail: afag@mail.ru

Prenatal ontogenezin mayalanma dövründə və 14 - 17 günlərində hipoksemik hipoksiyaya məruz qalmiş ağ siçovulların postnatal ontogenezin erkən (17- və 30-günlük) və cinsi yetkinlik (90-günlük) dövrlərində baş beynin müxtəlif strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri subhüceyrə fraksiyalarında piruvatkinaza (PK) fermentinin fəallığının dəyişmə dinamikasının bir sıra göstəricilərdən asılılığı (prenatal dövr, postnatal dövr, nahiyə, subhüceyrə səviyyəsi) aşkar olunmuşdur. Hipoksiyaya məruz qaldıqdan sonra postnatal ontogenezin 17- , 30- və 90-günlərində ağ siçovulların baş beyin nahiyələrində PK fermentinin aktivliyinin dəyişməsini müqayisə etdikdə görürük ki, hipoksiyanın təsirinə cavab olaraq postnatal dövrünün müddəti uzandıqca onun kontrol göstəricilərinin səviyyəsinə uyğun qismən bərpaya meyilliyi müşahidə olunur. Lakin bu prosesin dərəcəsi prenatal ontogenezdə hipoksiyanın aparıldığı mərhələdən asılıdır.

Açar sözlər: *piruvatkinaza, hipoksemik hipoksiya, ağ siçovul, prenatal ontogenez, postnatal ontogenez, baş beyin nahiyələri, enerji mübadiləsi, hüceyrə subfraksiyaları*

GİRİŞ

Hipoksiya geniş yayılmış, kliniki cəhətdən əhəmiyyətli stressogen faktorlara aiddir. Prenatal hipoksik stressin patogenetik effekti prenatal ontogenezin dövründən çox asılıdır. Prenatal hipoksiyanın patogenezində hüceyrə membranlarının struktur-funksional tamlığının pozulması mühüm rol oynayaraq, mərkəzi sinir sisteminin (MSS) fəaliyyətinə təsir edir (Трофимова, 2008). Bununla bərabər, MSS-in energetik mübadiləsində də böyük dəyişikliklər baş verir. Hipoksiya problemi fizioloqların və həkimlərin böyük maraq dairəsinə aid olmasına baxmayaraq, orqanizmin bətndaxili keçirdiyi hipoksiyanın sonrakı təzahürləri, demək olar ki, öyrənilməyib (Граф, 2006). Oksigenin xeyli hissəsi baş beyində gedən biokimyəvi reaksiyalarda istifadə olunur və baş beyin oksigen çatışmazlığına, yəni hipoksiyaya çox həssasdır. Bu zaman MSS daha çox patoloji dəyişikliklərə məruz qalır. Qeyd etmək vacibdir ki, hipoksiya postnatal inkişafın bütün mərhələlərində MSS-də mühüm fizioiloji, biokimyəvi və morfoloji dəyişikliklərlə nəticələnir (Анохина и Буравкова, 2010; Трофимова и др., 2010; Semenza et al. 2006).

Son illərin elmi ədəbiyyatında hipoksiya və qlükoza mübadiləsini kataliz edən fermentlər arasında olan asılılığı aşkar edən və öyrənən işlər çox məhdud saydadır. Məlumdur ki, oksigenin azlığı hüceyrələrdə qlükozanın tam parçalanmasına (üç karbon turşuları tsiklində) imkan vermir və onu toxumalarda əmələ gələn piruvatı laktata çevirir (Luc and Pierre, 2003; Mazurek et al. 2001). Bunun nəticəsində hüceyrənin daxilində pH azalır, yəni asidoz baş verir və biokimyəvi proseslərin tənzimlənməsi pozulur. Deyilənlər bu problemin nə dərəcədə vacib və aktual olduğunu təsdiq edir (Баба-заде, 2012; Rəşidova, 2011).

Bu tədqiqat işində biz prenatal ontogenezin mayalanma dövründə və 14 - 17 günlərində hipoksemik hipoksiyaya məruz qalmiş ağ siçovullarda postnatal ontogenezin erkən (17-və 30-günlük) və cinsi yetkinlik dövründə (90-günlük) baş beynin müxtəlif strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri subhüceyrə səviyyələrində piruvatkinaza (PK; ATF: piruvate phosphotransferase; EK 2.7.1.40) fermentinin fəallığının dəyişmə dinamikasının bir sıra göstəricilərdən asılılığını aşkar və müqayisəli analiz etməyi qarşımıza məqsəd qoymuşduq.

TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODLARI

Tədqiqatlar Avropa elm fondu və heyvanlara qarşı humanist münasibət haqqında Helsinki bəyannaməsinin tövsiyə etdikləri prinsip və normativ sənədlər əsasında 3 yaş dövrünə aid (17-, 30- və 90-günlük) ağ siçovullar üzərində aparılmışdır. Təcrübə heyvanları prenatal ontogenezin mayalanma dövründə və 14 - 17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış - xüsusi kamerada hər gün 20 dəqiqə olmaqla 5 gün ərzində 95% azot və 5% oksigen qaz qarışığı ilə nəfəs almışlar. Hipokiyaya məruz qaldıqdan sonra

postnatal ontogenezin 17, 30 və 90 günlərində dekapitasiya edilmiş, onların hipotalamus, beyincik, sensomotor, orbital və limbik qabıqlarının toxuma və subhüceyrə fraksiyalarında PK-nın ümumi və xüsusi fəallığı öyrənilmiş, zülalın miqdarı təyin edilmişdir (Лакин, 1990; Прохорова, 1982; Светухина,1968; Bergmeyer, 1975; Осадчая, 1999). Baş beyin nahiyələrinin toxumaları 1:9 nisbətində 0,2M tris-HCl buferi (pH 7,4); 1mM EDTA; 0,25M saxaroza tərkibli mühitdə homogenizasiya edilmiş və 10 dəq. ərzində 1000g rejimində K-24 markalı (Almaniya) refrijeratorlu sentrifuqada sentrifuqasiya edilmişdir. Alınan çöküntüdə qalmış tam dağılmamış hüceyrələr, nüvələr, toxuma qırıntıları xaric edilir. Supernatant 11000-14000 g-da 20 dəqiqə ərzındə sentrifuqalaşdırılır. Supernatantda sitozol mayesi, çöküntüdə isə mitoxondri kütləsi alınır. Sitozol mayesi 100000g-da, 1,5-2,0 saat ərzində differensial sentrifuqalaşma üsulu ilə “VAC-25”-də (Almaniya) sentrifuqalaşdırıldıqdan sonra supernatantda alınır. Mitoxondri kütləsi 5 ml 0,32M saxaroza məhlulunda teflon dəstəciklə resuspenziya edildikdən sonra 14000g-da sentrifuqalaşdırılır. Supernatant xaric edilir, yuyulmuş mitoxondri kütləsi fermentin fəallığını və zülalın qatılığını təyin etmək üçün istifadə olunur. PK fermentinin mitoxondridaxili maksimal fəallığını aşkar etmək üçün ilk növbədə cisimləri dağıtmaq lazımdır. Adətən mitoxondriləri dağıtmaq ücün bir neçə üsuldan istifadə olunur: ultrasəs vasitəsilə, dondurmaq və sonra onun donunu açmaq və detergentlər ilə təsir etmək. Biz tədqiqatlarımızda detergent təsirindən sonra dondurmaq və donunu açmaq üsulundan istifadə etmişik.

Kontrol kimi vivarium şəraitində saxlanılmış və hipoksiyaya məruz qalmamış eyni yaşda olan heyvanlardan istifadə olunmuşdur.

PK-nın aktivliyi H.U.Berqмeyer (1973) üsulu ilə LKB Ultralab-sisteminin reaksiya sürətinin analizatorunda (İsveç), ümumi zülalın miqdarı isə Louri üsulu ilə təyin olunmuşdur (Кочетов, 1980).

TƏDQIQATIN NƏTICƏLƏRI VƏ ONLARIN MÜZAKIRƏSI

Prenatal ontogenezdə hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların beyninin erkən postnatal ontogenezdə (17- və 30-günlük) və cinsi yetkinlik dövründə (90-günlük) baş beynin müxtəlif strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri səviyyələrində piruvatkinaza fermentinin fəallığının dinamikasının dəyişməsi təyin olunmuş və sübut olunmişdur ki, heyvanların beyninin müxtəlif strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri səviyyələrində piruvatkinaza fermentinin ümumi və xüsusi fəallığı dəyişilir.

Aparılan tədqiqatların nəticələri göstərdi ki, mayalanma dövründə prenatal hipoksiyaya məruz qalmış heyvanların beyninin müxtəlif strukturlarında toxuma, sitozol və mitoxondri səviyyələrində piruvatkinaza fermentinin ümumi və xüsusi fəallığı heç də həmişə birmənalı dəyişmir. Onun heyvanın yaşından, tədqiq olunan baş beyin nahiyəsindən və subhüceyrə fraksiyasının səviyyəsindən asılı olduğu aşkar edilmişdir (Cədvəl 1 və 2).

Belə ki, bu cədvəllərdən göründüyü kimi, təcrübi qrupdan olan 17-günlük siçovullarda baş beyin strukturlarının toxumasında PK-fermentinin göstəriciləri hər bir tədqiq olunan nahiyədə kontrol səviyyəsində olmuş, lakin xüsusi fəallığı təxminən 4-8 dəfə azdır, və hətta hipotalamusda öz kritik göstəricisinə çatır və kontrola nisbətən bu dəyişiklik yalnız 6% təşkil edir (<0.001).

30-günlük siçovullarda 17-günlük siçovullardan fərqli olaraq hər bir tədqiq olunan nahiyədə PK-fermentinin istər ümumi, istər xüsusi aktivliyi kontrola nisbətən toxumada 1.3-4.4 dəfə yüksəlir. Beyincikdə PK-nın xüsusi fəallığının göstəricisi istisna təşkil etmiş və kontrola nisbətən 18% (<0.001) olmuşdur.

90-günlük siçovullarda PK-nın aktivliyi nahiyədən asılı olaraq heç də birmənalı dəyişmir: orbital və sensomotor qabıqlarda ümumi fəallıq 1,7-3.0 dəfə yüksəldiyi halda, limbik qabıqda, hipotalamus və beyincikdə kontrolla müqayisədə fərq etibarsız olmuşdur (>0.05). Xüsusi fəallığının göstəricilərində belə bir mənzərə alınırdı: orbital qabıqda 2,7 dəfə yüksələn zaman, qalan nahiyələrdə kontrola nisbətən azalma müşahidə olunurdu (<0.01).

Mitoxondri səviyyəsində 17-günlük siçovullarda PK-nın fəallığı hər bir nahiyədə kontrol göstəricilərindən 3.0-5.0 dəfə, 30-günlük siçovullarda 1.3-12.5 dəfə, 90-günlüklərdə isə 2.0-7.4 dəfə artmış, yaxud kontrol səviyyəsində idi (<0.01; <0.001). Xüsusi fəallıq isə 30-günlük siçovullarda 3-4 dəfə azalmış (<0.001), 90-günlüklərdə isə1.3-3.0 dəfə kontrola nisbətən yüksəlmiş, orbital qabıq istisna olmaqla – burada 25% kontrola nisbətən azalmışdır(>0.05).

Sitozol subhüceyrə fraksiyasında 17-günlük siçovullarda PK-nın ümumi aktivliyi hər bir nahiyədə azalmış (<0.05;<0.001), lakin postnatal dövrü uzandıqca artması müşahidə olunur. Xüsusi fəallıq isə 17-günlük siçovullarda 2.4-4.0 yüksələn zaman, 30- və 90-günlərdə kontrola nisbətən azalması müşahidə olunur (<0.05; >0.05) (cədvəl 1, 2).

Prenatal ontogenezin 14-17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyninin müxtəlif strukturlarının - hipotalamus, beyincik, sensomotor, orbital və limbik qabıqların toxuma,

Cədvəl 1. Mayalanma dövründə hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyninin müxtəlif nahiyələrinin, toxuma, mitoxondri və sitozol subfraksiyalarında piruvatkinaza (PK) fermentinin ümumi fəallığı (µM NADH/1 q təzə beyin toxumasının çəkisinə/1 dəq, λ=340 nm, 25°C, M±m, n=6)

Beyin nahiyə-ləri	Göstə-ricilər	toxuma						mitoxondri						sitozol					
		17 gün		30gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün	
		kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə	kon-trol	təc-rübə
orbital qabıq	M	0,195	0,318	0,211	0,627	0,131	0,641	1,141	0,382	0,598	1,245	0,386	2,867	0,623	0,427	0,486	2,463	2,381	3,040
	±m	±0,01	±0.03	±0,02	±0.04	±0,01	±0.05	±0,11	±0.03	±0,06	±0.12	±0,04	±0.26	±0,04	±0.04	±0,03	±0.22	±0,24	±0.27
	P		<0.05		<0.001		<0.001		<0.001		<0.01		<0.001		<0.05		<0.001		>0.05
	%		163		297		489		34		208		743		69		507		128
sensor motor qabıq	M	0,309	0,323	0,153	0,659	0,323	0,541	0,999	0,359	0,854	1,272	0,42	1,622	0,599	0,414	0,516	2,358	2,517	3,035
	±m	±0,03	±0.03	±0,02	±0.05	±0,02	±0.04	±0,11	±0.02	±0,08	±0.09	±0,05	±0.13	±0,04	±0.03	±0,04	±0.17	±0,28	±0.25
	P		>0.05		<0.001		<0.001		<0.001		<0.05		<0.001		<0.05		<0.001		>0.05
	%		105		431		167		36		149		386		69		457		121
limbik qabıq	M	0,249	0,291	0,243	0,541	0,545	0,536	1,299	0,401	0,743	1,032	1,022	2,495	0,650	0,454	0,555	2,499	2,595	3,158
	±m	±0,02	±0.02	±0,03	±0.04	±0,04	±0.04	±0,13	±0.03	±0,05	±0.10	±0,08	±0.21	±0,05	±0.04	±0,04	±0.14	±0,18	±0.27
	P		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		<0.05		<0.001		>0.05
	%		117		223		98		31		139		244		70		450		122
hipota-lamus	M	0,214	0,209	0,182	0,704	0,318	0,404	0,886	0,349	0,82	0,845	0,329	1,141	0,891	0,204	0,418	2,040	2,513	2,508
	±m	±0,02	±0.01	±0,02	±0.06	±0,03	±0.03	±0,07	±0.02	±0,06	±0.08	±0,03	±0.09	±0,08	±0.01	±0,03	±0.15	±0,22	±0.22
	P		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		<0.001		<0.001		>0.05
	%		98		387		127		39		103		347		23		488		99
beyin-cik	M	0,196	0,164	0,132	0,495	0,366	0,427	0,863	0,167	0,164	0,418	0,502	0,977	0,922	0,486	0,633	2,258	1,922	3,999
	±m	±0,02	±0.01	±0,02	±0.03	±0,03	±0.04	±0,08	±0.01	±0,02	±0.03	±0,03	±0.08	±0,08	±0.03	±0,05	±0.19	±0,11	±0.30
	P		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		<0.001		<0.01		<0.01		<0.01		<0.001
	%		84		375		117		19		255		195		53		357		208

Cədvəl 2. Mayalanma dövründə hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyninin müxtəlif nahiyələrinin, toxuma, mitoxondri və sitozol subfraksiyalarında piruvatkinaza (PK) fermentinin xüsusi fəallığı (μM NADH/1 q təzə beyin toxumasının çəkisinə/1 dəq.,/1 mq zülala, λ=340 nm, 25°C, M±m, n=6)

Beyin nahiyələri	Göstəricilər	toxuma						mitoxondri						sitozol					
		17 gün		30gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün	
		kontrol	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**	**kontrol**	**təcrübə**
orbital qabıq	**M ±m**	0.178 ±0.02	0.063 ±0.005	0.151 ±0.02	0.209 ±0.01	0.375 ±0.02	1.020 ±0.07	0.137 ±0.01	0.141 ±0.01	0.451 ±0.04	0.143 ±0.01	1.604 ±0.11	1.195 ±0.12	0.107 ±0.01	0.388 ±0.02	0.374 ±0.03	0.347 ±0.02	0.541 ±0.04	0.475 ±0.03
	P		<0.01		<0.05		<0.001		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		>0.05		>0.05
	%		35		138		272		103		32		75		363		93		88
sensor motor qabıq	**M ±m**	0.281 ±0.03	0.065 ±0.005	0.116 ±0.01	0.213 ±0.02	0.636 ±0.04	0.541 ±0.04	0.099 ±0.01	0.109 ±0.007	0.562 ±0.05	0.141 ±0.01	1.030 ±0.08	1.352 ±0.11	0.118 ±0.01	0.318 ±0.01	0.420 ±0.04	0.314 ±0.01	0.793 ±0.06	0.632 ±0.05
	P		<0.001		<0.01		>0.05		>0.05		<0.001		<0.001		<0.001		<0.05		>0.05
	%		23		184		85		110		25		131		270		75		80
limbik qabıq	**M ±m**	0.208 ±0.01	0.047 ±0.003	0.174 ±0.02	0.164 ±0.01	0.719 ±0.05	0.488 ±0.03	0.089 ±0.01	0.111 ±0.006	0.559 ±0.05	0.178 ±0.01	0.358 ±0.02	0.832 ±0.05	0.086 ±0.006	0.350 ±0.02	0.555 ±0.04	0.373 ±0.03	0.797 ±0.06	0.619 ±0.04
	P		<0.001		>0.05		<0.01		<0.01		<0.001		<0.001		<0.001		<0.05		<0.05
	%		23		94		68		125		32		232		407		67		78
hipotalamus	**M ±m**	0.214 ±0.02	0.013 ±0.001	0.136 ±0.02	0.217 ±0.02	0.868 ±0.06	0.506 ±0.04	0.070 ±0.01	0.140 ±0.01	0.586 ±0.04	0.188 ±0.008	0.314 ±0.02	0.518 ±0.03	0.111 ±0.01	0.269 ±0.01	0.441 ±0.03	0.378 ±0.03	0.794 ±0.07	0.836 ±0.07
	P		<0.001		<0.05		<0.01		<0.01		<0.001		<0.01		<0.001		>0.05		>0.05
	%		6		160		58		200		32		165		242		86		105
beyincik	**M ±m**	0.140 ±0.01	0.017 ±0.001	0.941 ±0.07	0.165 ±0.01	0.564 ±0.05	0.285 ±0.02	0.084 ±0.01	0.065 ±0.003	0.149 ±0.01	0.127 ±0.008	0.198 ±0.02	0.611 ±0.04	0.113 ±0.01	0.442 ±0.02	0.621 ±0.04	0.610 ±0.04	0.785 ±0.08	0.784 ±0.06
	P		<0.001		<0.001		<0.01		>0.05		>0.05		<0.001		<0.001		>0.05		>0.05
	%		12		18		51		77		85		309		391		98		100

Cədvəl 3. Orqanogenezin 14-17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyninin müxtəlif nahiyələrinin, toxuma, mitoxondri və sitozol subfraksiyalarında piruvatkinaza (PK) fermentinin ümumi fəallığı (μM NADH/1 q təzə beyin toxumasının çəkisinə/1 dəq., λ=340 nm, 25°C, M±m, n=6)

Beyin nahiyələri	Göstəricilər	toxuma						mitoxondri						sitozol					
		17 gün		30gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün	
		kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə
orbital qabıq	M	0,195	0,145	0,211	0,281	0,131	0,599	1,141	0,845	0,598	1,402	0,386	1,545	0,623	0,473	0,486	1,508	2,381	2,249
	±m	±0,02	±0,01	±0,02	±0,04	±0,01	±0,07	±0,11	±0,06	±0,06	±0,27	±0,04	±0,17	±0,04	±0,03	±0,03	±0,16	±0,24	±0,22
	P		<0.05		<0.05		<0.001		<0.05		<0.05		<0.001		<0.05		<0.001		>0.05
	%		74		133		457		74		234		400		76		310		94
senso motor qabıq	M	0,309	0,141	0,153	0,391	0,323	0,459	0,999	0,795	0,854	0,972	0,42	2,099	0,599	0,613	0,516	1,763	2,517	2,535
	±m	±0,02	±0,01	±0,02	±0,10	±0,02	±0,03	±0,11	±0,06	±0,08	±0,10	±0,05	±0,27	±0,04	±0,07	±0,04	±0,18	±0,28	±0,25
	P		<0.01		<0.001		<0.01		>0.05		>0.05		<0.001		>0.05		<0.001		>0.05
	%		46		256		142		80		114		500		102		342		101
limbik qabıq	M	0,249	0,136	0,243	0,282	0,545	0,473	1,299	0,518	0,743	1,049	1,022	1,527	0,65	0,477	0,555	1,381	2,595	2,308
	±m	±0,02	±0,01	±0,03	±0,03	±0,04	±0,03	±0,13	±0,02	±0,05	±0,11	±0,08	±0,11	±0,05	±0,03	±0,04	±0,14	±0,18	±0,16
	P		<0.01		>0.05		>0.05		<0.001		<0.05		<0.01		<0.05		<0.01		>0.05
	%		55		116		87		40		141		149		73		249		89
hipotalamus	M	0,214	0,149	0,182	0,224	0,318	0,336	0,886	0,545	0,820	1,336	0,329	1,154	0,891	0,341	0,418	1,213	2,513	1,899
	±m	±0,02	±0,01	±0,02	±0,03	±0,03	±0,04	±0,07	±0,03	±0,06	±0,11	±0,03	±0,17	±0,08	±0,01	±0,03	±0,13	±0,22	±0,11
	P		<0.05		>0.05		>0.05		<0.01		<0.01		<0.01		<0.001		<0.001		<0.05
	%		70		123		106		62		163		351		38		290		76
beyincik	M	0,196	0,205	0,132	0,236	0,366	0,423	0,863	1,409	0,164	1,218	0,502	1,886	0,922	0,549	0,633	2,117	1,922	2,717
	±m	±0,02	±0,02	±0,02	±0,02	±0,03	±0,04	±0,08	±0,12	±0,02	±0,13	±0,03	±0,15	±0,08	±0,03	±0,05	±0,24	±0,11	±0,17
	P		>0.05		<0.01		>0.05		<0.01		<0.001		<0.001		<0.01		<0.001		<0.01
	%		105		179		116		163		743		372		60		334		141

Cədvəl 4. Orqanogenezin 14-17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyninin müxtəlif nahiyələrinin, toxuma, mitoxondri və sitozol subfraksiyalarında piruvatkinaza (PK) fermentinin xüsusi fəallığı (μM NADH/1 q təzə beyin toxumasının çəkisinə/1 dəq/1 mq zülala, λ=340 nm, 25°C, M±m, n=6)

Beyin nahi-yələri	Göstə-ricilər	toxuma						mitoxondri						sitozol					
		17 gün		30gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün		17 gün		30 gün		90 gün	
		kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə	kontrol	təcrübə
orbital qabıq	**M**	0.178	0.364	0.151	0.512	0.375	0.382	0.137	0.190	0.451	0.280	1.604	0.754	0.107	0.163	0.374	0.335	0.541	0.549
	±m	±0.02	±0.03	±0.02	±0.03	±0.02	±0.03	±0.01	±0.02	±0.04	±0.02	±0.11	±0.06	±0.01	±0.02	±0.03	±0.02	±0.04	±0.05
	P		<0.01		<0.001		>0.05		<0.05		<0.01		<0.001		<0.05		>0.05		>0.05
	%		205		339		102		139		62		47		152		90		102
senso motor qabıq	**M**	0.281	0.134	0.116	0.782	0.636	0.335	0.099	0.155	0.562	0.486	1.030	0.447	0.118	0.148	0.420	0.375	0.793	0.564
	±m	±0.02	±0.01	±0.01	±0.06	±0.04	±0.02	±0.01	±0.02	±0.05	±0.03	±0.08	±0.03	±0.01	±0.01	±0.04	±0.02	±0.06	±0.05
	P		<0.001		<0.001		<0.001		<0.05		>0.05		<0.001		>0.05		>0.05		<0.05
	%		48		674		53		157		86		43		125		89		71
limbik qabıq	**M**	0.208	0.130	0.174	0.201	0.719	0.270	0.089	0.128	0.559	0.239	0.358	0.382	0.086	0.133	0.555	0.242	0.797	0.616
	±m	±0.01	±0.01	±0.01	±0.02	±0.05	±0.02	±0.01	±0.01	±0.05	±0.03	±0.02	±0.03	±0.006	±0.01	±0.04	±0.02	±0.06	±0.04
	P		<0.01		>0.05		<0.001		<0.05		<0.01		>0.05		<0.01		<0.001		<0.05
	%		63		116		38		144		43		107		155		44		77
hipota lamus	**M**	0.214	0.263	0.136	0.224	0.868	0.247	0.070	0.165	0.586	0.557	0.314	0.350	0.111	0.296	0.441	0.270	0.794	0.633
	±m	±0.02	±0.02	±0.01	±0.02	±0.06	±0.02	±0.01	±0.01	±0.04	±0.04	±0.02	±0.02	±0.01	±0.02	±0.03	±0.02	±0.07	±0.04
	P		>0.05		<0.01		<0.001		<0.001		>0.05		>0.05		<0.001		<0.01		>0.05
	%		123		168		28		236		95		111		267		61		80
beyin cik	**M**	0.140	0.682	0.941	0.148	0.564	0.211	0.084	0.282	0.149	0.230	0.198	0.343	0.113	0.134	0.621	0.353	0.785	0.639
	±m	±0.01	±0.04	±0.07	±0.02	±0.05	±0.01	±0.01	±0.03	±0.01	±0.02	±0.02	±0.02	±0.01	±0.01	±0.04	±0.02	±0.06	±0.04
	P		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.05		<0.01		>0.05		<0.001		>0.05
	%		487		16		37		336		154		173		119		57		81

sitozol və mitoxondri səviyyələrində piruvatkinaza fermentinin ümumi və xüsusi fəallığı dəyişilir və bu dəyişmə heç də bir mənalı olmayıb: heyvanın yaşından, tədqiq olunan baş beyin nahiyəsindən və subhüceyrə səviyyəsindən asılı olduğu aşkar edilmişdir (Cədvəl 3, 4).

Cədvəl 3-dən göründüyü kimi, erkən postnatal ontogenezdə toxuma səviyyəsində orbital qabıqda PK-nın fəallığı azalan zaman, 90-cı gün bu göstəricilər kontrol səviyyəsindən 4,6 dəfə yüksək olmuş və 457 % təşkil etmişdir (< 0,001).

Sensomotor, limbik qabıqlarda və hipotalamusda PK fermentinin fəallığının dinamikasında oxşar mənzərə müşahidə olunur – baxmayaraq ki, fermentin fəallığı 17-ci gün kontrola nisbətən azalır (46; 55 və 70 %), 30-cu gün 2,5 dəfəyədək yüksəlir, lakin postnatal dövr uzandıqca (90-cı gün) kontrol səviyyəsinə çatmağa meyilli olur və hətta ona çatır. Beyincikdə PK fermentinin fəallığının səviyyəsi hər bir tədqiq olunan postnatal dövrdə kontrol göstəricilərindən yüksəkdir (105; 179 və 116 % ; p< 0,001).

30-günlük siçovullarda 17-günlük siçovullardan fərqli olaraq, hər bir tədqiq olunan nahiyədə PK fermentinin istər ümumi, istər xüsusi aktivliyi kontrola nisbətən toxumada 1,2 -6,7 dəfə yüksəlir.

90-günlük siçovullarda PK-nın ümumi aktivliyi orbital, sensomotorqabıqlarda və beyinçikdə 1,2-4,5 dəfə kontrola nisbətən yüksəldiyi zaman, limbik qabıqda azalmiş, (87%; p>0,05), hipotalamusda isə kontrol səviyyəsində olmuşdur (106%; p>0,05) (Cədvəl 3).

Xüsusi fəallığa gəldikdə görürük ki, postnatal dövrü uzandıqca fermentin fəallığı etibarlı dərəcədə azalır, və bu daha kəskin beyincikdə müşahidə olunur (p< 0,001) (Cədvəl 4).

Tədqiq olunan beyin nahiyələrinin mitoxondri subhüceyrə fraksiyalarında 17-günlük siçovullarda PK-nın fəallığı hər bir nahiyədə kontrol göstəricilərindən aşağıdır, yalnız beyincik istisna təşkil etmişdir - burada fermentin fəallığı 1.409 μM NADH/1 q təzə tox./1 dəq. olmuşdur, yəni 63% kontrol səviyyəsindən yüksəkdir (p< 0,01).

Orbital, sensomotor, limbik qabıqlarda və hipotalamusda PK fermentinin fəallığının dinamikasında oxşar mənzərə müşahidə olunur – yəni, postnatal dövr uzandıqca (30 və 90 günədək) PK-nın fəallığı artır, və hətta kontrol səviyyəsindən 1,2-5,0 dəfə çoxalır (<0.05; <0,01;<0,001). Beyincik yenə də istisna təşkil etmişdir – göründüyü kimi, burada postnatal ontogenezin 30-cu günü PK fermentinin maksimum fəallığı müşahidə edilirdi (743%), 90-cı gün onun kontrol səviyyəsinə enməyə meyillilik aşkar olunmuşdur (372%; <0,001) Xüsusi fəallığda isə əks dinamika müşahidə olunur- postnatal ontogenezin vaxtı uzandıqca, PK-nın fəallığı azalır (Cədvəl 2).

Beyin nahiyələrinin sitozol subhüceyrə fraksiyalarında PK-nın fəallığının postnatal ontogenezdə dəyişmə dinamikası oxşar mənzərə verir. Belə ki, 17 –cı gün sensomotor qabıq istisna olmaqla (konrol səviyyəsində idi), fermentin fəallığı kontrola nisbətən 1,2-3,0 dəfə azalaraq, 30-cu gün 2,5-3,5 dəfə artmış və 90-cı gün kontrol səviyyəsinə enmişdir. Bu zaman, 3-cü cədvəldən göründüyü kimi, yenədə beyincik istisna təşkil etmiş, fəallığı 2.72 μM NADH/1 q təzə tox./1 dəq. göstərmiş və 41% kontrol səviyyəsindən yüksək olmuşdur (p< 0,01).

PK fermentinin fəallığının dəyişmə dinamikasını yaşdan asılılığını ümumiləşdirib qeyd etmək olar ki, 17-günlük heyvanların öyrənilən strukturlarının toxuma və subhüceyrə fraksiyalarında piruvatkinazanın fəallığı əsasən hər bir tədqiq olunan nahiyədə kontrola nisbətən təxminən 1,2- 7,4 dəfə azalır. 30-günlük heyvanların öyrənilən strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri subfraksiyalarında PK-fermentinin fəallığı 17- günlük heyvanlarla müqayisədə kəskin yüksəlmiş, və hətta kontrol göstəricilərinə nisbətən 1,5-7,0 dəfə yüksəlmişdir. 90-günlük heyvanların öyrənilən strukturlarının toxuma və mitoxondri səviyyələrində PK fermentinin fəallığı əsasən kontrola nisbətən yüksəlir, və yalnız sitozolda kontrol səviyyəsində olur, və hətta bu səviyyədən azalmağı müşahidə olunur (hipotalamusda 76% təşkil etmiş, p< 0,05) (Cədvəl 3).

Hipoksiyanın təsirinə cavab olaraq postnatal dövrünün müddəti uzandıqca PK-fəallığının kontrol göstəricilərinə uyğun bərpa meyilliliyi müşahidə olunur. Fermentin xüsusi fəallığının dəyişmə dinamikasında əks mənzərə müşahidə olunur- 90-cı gün onun fəallığı azalır (Cədvəl 4).

Siçovulların baş beyninin müxtəlif strukturlarında zülalın ümumi miqdarının tədqiqi zaman məlum olmuşdur ki, hipoksiyanın təsirindən heyvanın yaşından asılı olaraq zülalın miqdarının dinamikası eyni tipli dəyişmir. Təcrübələrdə prenatal ontogenezin mayalanma dövründə hipoksiyanın nəticəsində 17- və 30-günlük siçovullarda baş beyin nahiyələrinin hər bir tədqiq olunan səviyyəsində zülalın səviyyəsi aşağı düşmüş və beyincikdə öz kritik göstəricisinə çatmışdır (17,1%). Bu zaman 17-günlük siçovulların baş beyin nahiyələrinin toxumalarında isə zülalın kəskin artımı qeydə alınmışdır. 90-günlük siçovullardada zülalın artımı qeydə alınmışdır. Prenatal orqanogenezin 14 - 17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların postnatal dövrün 17- və 30-günlərində zülalın səviyyəsinin enməsi qeyd olunub, və, hətta 30-gün bu enmə maksimal göstəricisinə çatmışdır. Lakin 90-cı gün

orbital qabığının toxumasında və mitoxondri səviyyəsində zülalin miqdarının 2 - 9 dəfə artması müşahidə edilmişdir. Yalnız sensomotor qabığının sitozol subfraksiyasında postnatal dövrü uzandıqca zülalın miqdarının kontrol səviyyəsinədək bərpası nisbətən zəif getmiş – burada 90-cı günə onun miqdarı yalnız 47,8% təşkil etmişdir, qalan strukturlarda isə normal həddə nisbi sabitlik müşahidə edilmişdir.

Alınan nəticələri müqayisə etdukdə görürük ki, hipoksiyanın təsirinə cavab olaraq postnatal dövrünün müddəti uzandıqca PK-fəallığının kontrol göstəricilərinə uyğun bərpası meyilliliyi müşahidə olunur. Lakin bu təqribən 90-cı günə təsadüf edir.

Aparılan tətqiqatların nəticələri göstərir ki, prenatal ontogenezin mayalanma dövründə və orqanogenezin14 - 17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların erkən postnatal ontogenezdə baş beyninin müxtəlif strukturlarının (hipotalamus, beyincik, sensomotor, orbital və limbik qabıqların) toxuma, sitozol və mitoxondri subhüceyrə fraksiyalarında PK-fermentinin fəallığının dinamikasında əsaslı dəyişikliklər baş verir. Bu dəyişikliklər bir sıra parametrlərdən müəyyən qədər asılıdır.

Beləliklə, postnatal ontogenezin 17- , 30- və 90-günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovulların baş beyin nahiyələrində PK fermentinin aktivliyinin dəyişməsi dinamikasının müqayisəli analizi göstərir ki, hipoksiyanın təsirinə cavab olaraq postnatal dövrünün müddəti uzandıqca onun kontrol göstəricilərinə uyğun bərpası meyilliliyi müşahidə olunur. Lakin bu prosesin dərəcəsi hipoksiyaya məruz qalmış prenatal ontogenezin mərhələsindən müəyyən qədər asılıdır. Başqa sözlə, toxuma səviyyəsində hər iki prenatal mərhələlərdə hipoksiyanın təsirinə məruz qalmış siçovulların postnatal ontogenezdə baş beyin nahiyələrində PK fəallığının dinamikası oxşar olaraq dəyişir və 30-cu gün maksimal həddə çatır. Lakin, prenatal ontogenezin 14-17 günlərində hipoksiyanın təsirinə məruz qalmış siçovulların orbital qabığından alınmış göstəricilər istisna təşkil etmişdir - burada PK fermentinin fəallığının maksimumu 90-cı günə təsadüf edirdi və 4,5 dəfə kontrola nisbətən yüksək olmuşdur.

Mayalanma dövründə hipoksiyaya məruz qalmış siçovullarda mitoxondri səviyyəsində fermentin ümumi fəallığının maksimum həddi 90-cu gün müşahidə olunmuşdur, xüsusi fəallığının isə 90-cı günündə kontrol səviyyəsinə bərpa olunma meyilliliyi aşkar olunmuşdur. Prenatal ontogenezin 14-17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış siçovullarda postnatal ontogenezdə PK-nın fəallığının yüksələn xətt üzrə artması, beyincikdə isə onun tədricən azalması müşahidə edilmişdir.

Sitozol səviyyəsində PK-nın hiperaktivliyi 30-cu günə təsadüf edir, və 90-cı gündə kontrol səviyyəsinə enməsi meyilliliyi müşahidə edilmişdir.

Prenatal ontogenezin mayalanma dövründə və 14 - 17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış 17-, 30- və 90-günlük olan heyvanların baş beyin nahiyələrində PK-fermentinin fəallığının dəyişməsini müqayisə etdikdə, postnatal dövrünün müddəti uzandıqca, əksər hallarda, PK-fəallığının kontrol göstəricilərinə uyğun bərpası meyilliliyi müşahidə olunur;

Prenatal ontogenezdə hipoksiyaya məruz qalmiş ağ siçovullarin baş beynində piruvatkinazanin fəallığının müqayisəli analiz etdikdə, prenatal ontogenezin 14 - 17 günlərində hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçovullarda postnatal ontogenezdə PK-fermentinin fəallığının daha ləng getməyi müəyyən olunmuş, lakin mitoxondri səviyyəsində, beyincik istisna olmaqla, onun yüksəlməsi qeyd olunmuşdur. Müqayisə etdukdə gorürük ki, hipoksiyanın təsirinə cavab olaraq postnatal dövrünün müddəti uzandıqca PK-fəallığının kontrol göstəricilərinə uyğun bərpası meyilliliyi müşahidə olunur. Lakin bu qismən 90-cı günə təsadüf edilir. Bunu da belə izah etmək olar ki, orqanogenez dövründə hipoksiyaya məruz qalmış analardan alınan balalarda postnatal dövrdə onun (yəni, hipoksiyanın) yaratdığı ağır və dayanıqlı uzunmüddətli fəsadlar müşahidə olunur (Лукьянова, 2000; Меерсон, 1993). Yəni, təcrübə heyvanları özləri hipoksiyaya bilavasitə məruz qalmasalarda, PK-fermentinin fəallığında müşahidə olunan dəyişiklikləri analarından epigenetik, və yaxud başqa üsul ilə alındığını güman etmək olar.

Alınan nəticələrdən göründüyü kimi, siçovullar özləri bilavasitə hipoksiyaya məruz qalmasalar da, onların orqanizmində ciddi dəyişikliklər baş vermişdir. Yəni, postnatal inkişafın 17-ci günündə, gözlərinin açılması zaman, onların baş beynində hipoksiyaya məruz qalmış orqanizmlərdə gedən oxşar proseslər müşahidə olunurdu. 30-cu gün, orqanların formalaşmasının başa çatdığı dövrdə, enerji təminatı prosesi öz maksimal göstəriciləri həddinə çatır. Lakin 90-cı gün, yəni cinsi yetkinlik yaşına çatmış heyvanlarda, enerji təminatı prosesinin kontrol səviyyəyə enməsi müşahidə edilmişdir. Bu bir daha təsdiqləyir ki, prenatal dövrdə hipoksiyaya məruz qalmış heyvanlarda adaptiv-kompensator mexanizmi dəyişilir (Журавин и др., 2009). PK-nın hipoksiya zamanı yüksəlməsini onun baş beyin strukturlarının sinir hüceyrələrində biosintetik və bioenergetik proseslərin tənzimi mexanizmində metabolik pozğunluqların qarşısını almaq qabiliyyəti ilə izah etmək olar. Alınan faktiki nəticələr PK-fermentinin fəallığının dəyişməsinə adaptiv cavab olaraq hüceyrədaxili enerji mübadilisinin müvəqqəti artmasına gətirib çıxaran hipoksiyanın təsirinə

hüceyrə reaksiyasının mühüm determinantı kimi baxmağa imkan verməklə, funksional neyrokimyanı yeni məlumatlarla zənginləşdirirlər.

ƏDƏBİYYAT

Rəşidova A.M. (2011) Kəskin hipoksiyaya məruz qalmış ağ siçjvulların baş beynin müxtəlif strukturlarının subfraksiyalarında piruvatkinaza fermentinin fəallığının dəyişmə dinamikası. AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya institutunun və Fizioloqlar cəmiyyətinin elmi əsərləri külliyyatı, XXIX cild, s. 110-116.

Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. (2010) Механизмы регуляции транскрипционного фактора HIF при гипоксии. (Обзор) ж.Биохимия, **т.75**, с. 185-195.

Баба-заде С.Н. (2012) Влияние хронической гипоксии, перенесенной во время зачатия, на активность гексокиназы в различных участках головного мозга белых крыс в постнатальном онтогенезе. Тр. Института Физиологии им. А.И. Караева и общества физиологов Азербайджана «Проблемы физиологии и биохимии», Баку, т.XXX, с.177-180.

Граф А.В., Маклакова А.С., Маслова М.В. и др. (2006) Влияние пренатальной гипоксии, проведенной на стадии органогенеза, на поведение белых крыс в постнатальном периоде. Изв. РАН (сер. Биологическая), **№ 4**, с. 476-481.

Граф А.В., Гончаренко Е.Н., Соколова Н.А. и др. (2008) Антенатальная гипоксия: участие в развитии патологий ЦНС в онтогенезе **т.25**, № 1-2, с.11-16.

Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С.(2009) Изменение адаптивных механизмов мозга в онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию. Доклады Академии наук, **т.425**, №1, с.123-125.

Кочетов Г.А. (1980) Практическое руководство по энзимологии, М., «Высшая школа», 224.

Лакин Г.Ф. (1990) «Биометрия», М., «Наука», 352 с.

Лукьянова Л.Д.(2000) Современные проблемы гипоксии. Вест.РАМН, №9, с.3-12.

Меерсон Ф.З. (1993) Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации. М.Дело, 138 с.

Прохорова М.И. (1982) Кн. Методы биохимических исследований. Изд-во С.-П. Унив., с. 29-43.

Светухина В.М. (1968) Цитоархитектоника новой коры мозга в отряде грызунов. Архив анатомии, эмбриологии и гистологии. **42**, **№2**, с.31-45.

Трофимова Л.К, Маслова М.В., Граф А.В. и др. (2008) Влияния антенатального гипоксического стресса разной этиологии на самцов: корреляция поведенческих паттернов с изменениями активности антиоксидантной защиты и метаболизма ГАМК. Нейрохимия, **т.25**, **№ 1-2**, с.86-89.

Трофимова Л.К, Граф А.В., Маслова М.В. и др. (2010) Поведение половозрелых белых крыс, подвергнутых антенатальной прерывистой гипоксии в период раннего онтогенеза: гендерные отличия. Изв. Рос. Академии наук (сер. Биологическая), **№ 1**, с. 54-59.

Bergmeyer H.U. (1975) Biochemistry information. Methods of Enzymatic Analysis, v. **II**, p.82-83.

Luc P., Pierre J.M. (2003) How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. J. Physiology, **546**, **2**, p.325.

Mazurek S., Zwerschke W., Jansen-Dürr P. et al. (2001) Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. Biochemical Journal, **356**,247-256.

Semenza G.L., et al. (2006) Transkriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. Journal of Experimental Biology. **209**. p.3851-3861.

Сравнительный Анализ Активности Пируваткиназы Мозга Белых Крыс, Подвергнутых Гипоксической Гипоксии На Двух Этапах Пренатального Онтогенеза

А.М. Рашидова, Т.М. Агаев

Институт физиологии им. А.И.Караева НАНА

Выявлена зависимость изменения динамики активности фермента пируваткиназы (ПК) в различных структурах головного мозга тканевой, субклеточных цитозольной и митохондриальной фракциях от ряда показателей (пренатальный период, постнатальный период, область, субклеточный уровень) в период оплодотворения пренатального онтогенеза и на 14 - 17 день гипоксемической гипоксии белых крыс, в период раннего постнатального онтогенеза (17 - и 30- дневная) и полового созревания (90-дневная). При сравнении изменения в ферментативной активности ПК в различных областях головного мозга белых крыс после действия гипоксии на 17 - , 30 - и 90- день онтогенеза можем увидеть, что по мере продвижения постнатального периода в ответ на воздействие гипоксии наблюдается склонность к частичному восстановлению, близкая к уровню контрольных показателей. Однако интенсивность этого процесса зависела от стадии пренатального онтогенеза, подвергнутой гипоксии.

Ключевые слова: *пируваткиназа, гипоксемическая гипоксия, белая крыса, пренатальный онтогенез, постнатальный онтогенеза, области головного мозга, обмен энергией, субклеточные фракции*

Comparative Analysis of Brain Pyruvate Kinase Activity Of White Rats Exposed To Hypoxic Hypoxia During Two Stages Of Prenatal Development

A.M. Rashidova, T.M.Aghayev

Institute of Physiology named after A.I.Garayev, ANAS

Some relationships between the changes in the dynamics of brain pyruvate kinase (PK) activity and some indices (prenatal period, postnatal period, brain structures, brain subfractions) have been revealed in tissue, cytosol and mitochondrial subfractions of different brain structures of white rats exposed to hypoxic hypoxia in fertilization period, on 14-17 days of prenatal ontogenesis, early ontogenesis (17 - и 30- days) and puberty period (90 days). Comparison of the PK-activity of some brain structures of white rats exposed to hypoxic hypoxia during prenatal ontogenesis revealed tendency towards the restoration of the PK-activity up to control level with increasing postnatal development on 17-, 30- and 90 days. However, the intensity of this process depends on the stage of prenatal ontogenesis subjected to hypoxia.

Key words: *pyruvate kinase, hypoxic hypoxia, white rat, prenatal ontogenesis, postnatal ontogenesis, brain structures, energy metabolism, cell subfractions*